

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari bulan Maret 2016 sampai Juni 2016. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain :

- a. Proses determinasi sampel dilakukan di Laboratorium Departemen Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- b. Proses ekstraksi, pemisahan dan pemurnian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Gedung B Lantai 4 FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- c. Proses karakterisasi senyawa yaitu pengujian spektroskopi IR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan pengujian spektroskopi  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC dan HMBC dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

#### 3.2. Alat dan Bahan Penelitian

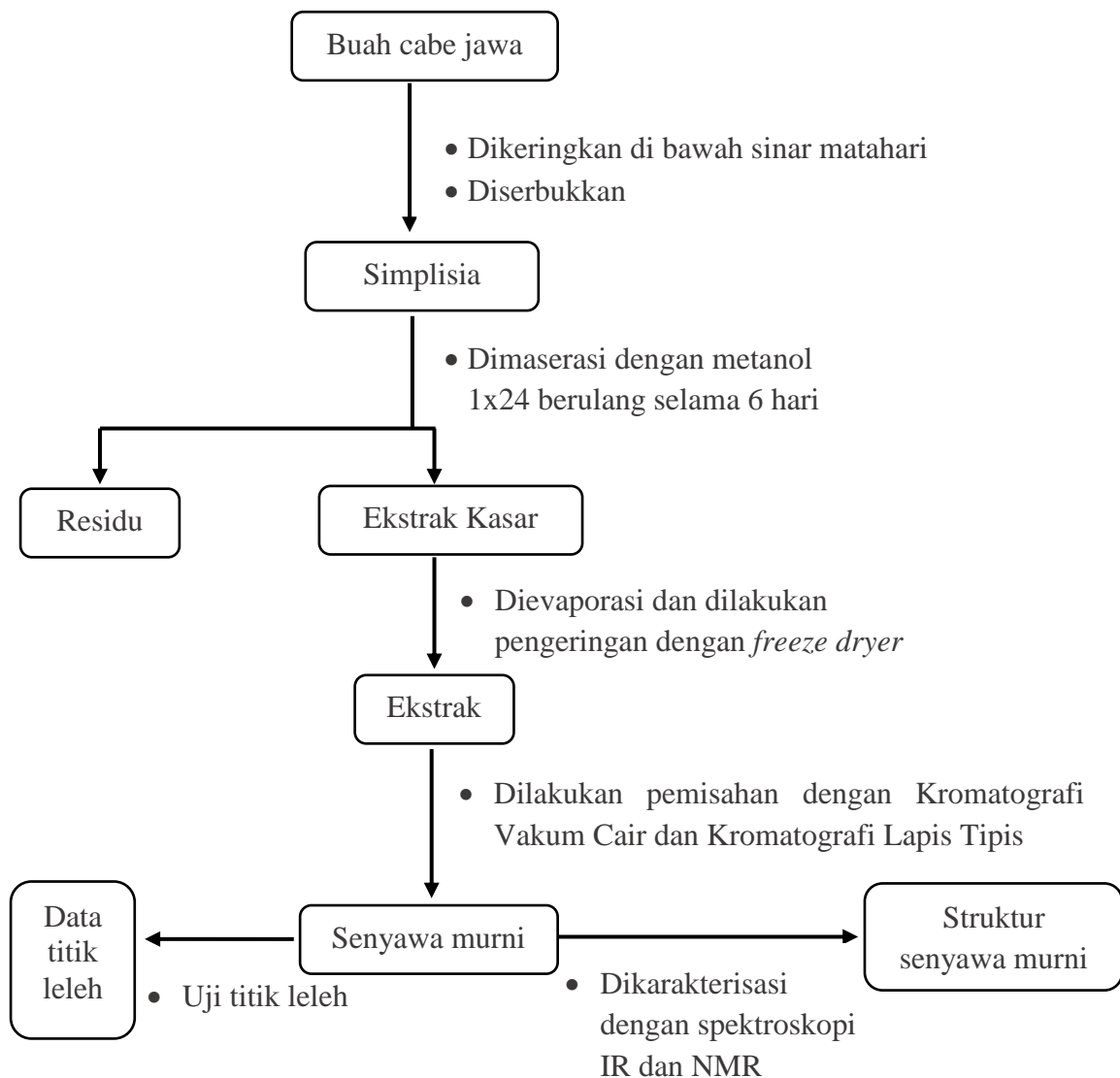
Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas, set peralatan destilasi, corong *buchner*, *vacuum rotary evaporator*, set peralatan *freeze dryer*, set peralatan KVC dengan kolom berdiameter 7 cm, set peralatan KLT, set alat *melting point block*, set instrumen *Infra Red* (IR) yaitu FTIR SHIMADZU 8400, dan set instrumen NMR 1D dan 2D yaitu NMR AGILENT 500 MHz ( $^1\text{H}$  NMR), 125 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR), NMR HSQC dan HMBC.

Sampel yang digunakan berupa tanaman *P. retrofractum* (cabe jawa) yaitu bagian buahnya. Tanaman cabe jawa yang digunakan diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang (Jawa Barat) yang dikumpulkan pada bulan Desember 2015. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi metanol, n-heksana, dan etil asetat yang diperoleh dalam grade teknis (yang kemudian dilakukan destilasi) serta aseton dan kloroform yang diperoleh dalam *grade pro analis* (p.a), akuades dan kertas saring. Selain itu, digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh)

for chromatography column dan plat KLT silika gel 60 GF<sub>254</sub> dengan ketebalan 0,25 mm.

### 3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahapan penelitian, yaitu preparasi sampel, ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, serta karakterisasi senyawa piperin dengan metode spektroskopi. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 3.1 yang merupakan bagan alir penelitian.



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

### 3.3.1. Preparasi sampel

Sampel tanaman *P. retrofractum* (cabe jawa) bagian buahnya dikumpulkan dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang (Jawa Barat). Sampel ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui massa awal. Kemudian sampel tersebut dibersihkan lalu dikeringkan dibawah sinar matahari dan diserbukkan.

### 3.3.2. Ekstraksi

Serbuk buah *P. retrofractum* (cabe jawa) diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair yaitu dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol selama 1x24 jam dan dilakukan berulang selama 6 hari. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong *bunchner*, lalu dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak metanol hasil evaporasi kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* dan ditimbang massanya.

### 3.3.3. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Piperin

Sebelum dilakukan pemisahan, terlebih dahulu dilakukan pencarian eluen dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mencari eluen yang cocok untuk digunakan dalam tahapan pemisahan. Setelah itu, ekstrak dilarutkan dengan aseton dan diimpregnasi ke dalam silika untuk dilakukan pemisahan menggunakan metode Kromatografi Vakum Cair (KVC) dengan kolom berdiameter 7 cm menggunakan eluen n-heksana, etil asetat, dan metanol dengan berbagai perbandingan sehingga diperoleh fraksi n-heksana, etil asetat, dan fraksi metanol sisa. Kemudian dilakukan Kromatografi Lapis Tipis terhadap semua fraksi untuk melihat profil kandungan senyawa yang ada pada fraksi-fraksi tersebut berdasarkan pola noda pada plat KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki profil noda yang mirip kemudian digabungkan menjadi satu dan dipekatkan untuk diketahui massanya, yaitu terdiri dari fraksi A, B, C dan D yang kemudian dilakukan KLT dengan piperin standar sebagai pembanding. Pada fraksi D kemudian dilakukan proses kristalisasi hingga terbentuk kristal. KLT kembali dilakukan pada senyawa yang berhasil diisolasi untuk mengetahui senyawa yang diperoleh sudah murni atau belum dengan melihat profil noda pada plat KLT.

### 3.3.4. Karakterisasi Senyawa Piperin

Karakterisasi senyawa piperin dilakukan melalui uji sifat fisik yaitu dengan uji titik leleh menggunakan *melting point block*, sedangkan pada penentuan rumus struktur senyawa, dilakukan beberapa tahapan yaitu senyawa murni yang diperoleh dari hasil isolasi dikarakterisasi menggunakan beberapa teknik spektroskopi antara lain spektroskopi *Infra Red* (IR), spektroskopi  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), serta NMR 2D yaitu HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) dan HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) untuk mengidentifikasi rumus struktur senyawa yang telah berhasil diisolasi.